

Протидифтерійні властивості структурно-метаболітних комплексів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів у тестах *in vitro* та *in vivo*

О. Ю. Ісаєнко

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків; e-mail: el_isaenko@ukr.net

Досліджено *in vitro* та *in vivo* протимікробні властивості структурних компонентів і продуктів життєдіяльності пробіотичних штамів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* проти окремих представників патогенних збудників дифтерії та непатогенних коринебактерій. Дезінтегранти (структурні компоненти) одержано завдяки низькочастотній ультразвуковій обробці пробіотичних клітин *L. rhamnosus* GG або *S. boulardii*. Метаболіти отримано за авторською методикою культивуванням лактобактерій та сахароміцетів у власних дезінтегратах, а їхня комбінація – в дезінтегратах лактобактерій. У тестах *in vitro* фільтрати лактобактерій за 2 год впливу бактерицидно діяли (100%) на токсигенні коринебактерії ($n = 10$) при застосуванні посівної дози тест-культур (0,5 од. за шкалою McFarland, розведена в 10 разів), а фільтрати сахароміцетів проявили меншу активність (80%) за показниками життєздатності токсигенних представників роду *Corynebacterium* ($n = 10$). Спільне культивування *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, в ультразвуковому дезінтеграді клітин пробіотичних лактобактерій, сприяло підвищенню протимікробної активності комбінації метаболітів щодо патогенних коринебактерій. У тесті *in vivo* на морських свинках встановлена протимікробна активність метаболітів лактобактерій і комбінації метаболітів лактобактерій із сахароміцетами та доведена їхня ефективність для місцевого лікування (тричі на добу впродовж тижня) дифтерійної інфекції очей. Отримані результати можуть бути використані для створення на основі *Lactobacillus* і *Saccharomyces* протимікробних структурно-метаболітних комплексів для попередження розвитку безсимптомних форм дифтерійної інфекції, санації носіїв дифтерії та додаткового місцевого лікування дифтерії ока.

Ключові слова: метаболіти; структурні компоненти; протимікробні властивості; дифтерія; *Lactobacillus rhamnosus* GG; *Saccharomyces boulardii*.

ВСТУП

На ринку фармацевтичних продуктів представлено велику кількість, а в клінічній практиці широко застосовують, не лише монокомпонентні пробіотики, до складу яких входить один вид бактерій, а і комбіновані препарати, що являють собою поєднання мікроорганізмів різних видів: лактобактерій і сахароміцетів, лактобактерій і біфідобактерій, біфідобактерій і апатогенних штамів *Escherichia coli*. Відомо, що суміш бактерій має

більшу антагоністичну активність порівняно з чистими культурами мікроорганізмів, завдяки чому успішно застосовуються комерційні полікомпонентні пробіотики – «Окарін», «Біфікол», «Біфіформ» [1–4]. Встановлено також стимулювання антимікробних речовин штама-антагоніста клітинними компонентами (метаболітами і фрагментами клітинних стінок) бактеріальних культур [5, 6].

Похідні та продукти життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів проявляють протимікробні властивості до широкого

спектра грампозитивних, грамнегативних бактерій, грибів, полірезистентних мікроорганізмів, впливають на процеси біоплівкоутворення та здатні деградувати раніше сформовані біоплівки патогенних збудників [5, 6]. У доступній літературі нами не знайдено даних щодо застосування продуктів життєдіяльності пробіотичних штамів мікроорганізмів як протимікробних препаратів проти патогенних збудників дифтерії. Проте на сьогодні дифтерія залишається актуальною проблемою. Так, в 2017 р. про епідемію дифтерії сповістили ВООЗ та просили допомоги у проведенні протидифтерійних заходів Венесуела, Індонезія, Йемен, Бангладеш (в Кокс-Базарі) [7]. В 2018 р. ВООЗ повідомило, що в усьому світі реальною загрозою стає зараження дифтерією: за два місяця лише в Йемені загинуло від дифтерії 48 людей, а кількість хворих сягало 678 чоловік [8]. Міністерство охорони здоров'я України *повідомляє* «У зв'язку з небезпечністю хвороби та низьким рівнем охоплення щепленнями проти дифтерії в Україні, МОЗ рекомендує вакцинацію для дітей і ревакцинацію для дорослих (кожні 10 років)». На 28 жовтня 2019 р. в Україні лабораторно встановлено та МОЗ підтверджено 20 (протягом жовтня – 18), випадків захворювання на дифтерію.

Особливу небезпеку являють здорові носії коринебактерій [9]. Завдяки відсутності зовнішніх ознак інфекції й не контролюваному поширенню збудника, значна кількість випадків зараження зумовлена контактом із здоровими носіями дифтерійної палички. Особливо кількість безсимптомних носіїв серед населення збільшується під час спалаху епідемії дифтерії, що вимагає безперечної уваги. Терапія важких форм цього захворювання, яка характеризується швидким перебігом та необоротним ураженням багатьох органів, потребує додаткового лікування, що дасть змогу значно скоротити тривалість патології. Внаслідок високої активності й безпечності продуктів

життєдіяльності лактобактерій і сахароміцетів їх можна використовувати як основу при розробці препаратів для попередження розвитку безсимптомних форм дифтерійної інфекції, для санації носіїв дифтерії, а також як додаткову терапію при лікуванні дифтерії очей, носу, вуха, шкіри, статевих органів (місцево полоскання, промивання та зрошення).

Метою нашої роботи було вивчення *in vitro* та на моделі дифтерійної інфекції очей *in vivo* антибактеріальних властивостей біологічно активних речовин *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* з можливістю створення на їхній основі протимікробних комплексів для попередження розвитку безсимптомних форм дифтерійної інфекції та санації носіїв дифтерії.

МЕТОДИКА

Як продуценти метаболітів використовували гриби *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату BULARDI® («Schonen», Швейцарія) та пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus* GG з симбіотика PREEMA® («Schonen», Швейцарія). Дослідження протимікробної активності біологічно активних структурно-метаболітних комбінацій, метаболітних сполук та структурних компонентів клітин пробіотичних мікроорганізмів проводили на тест-культурах *Corynebacterium spp.*, що зберігаються в колекції мікроорганізмів лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН». Штами мікроорганізмів, які використовували в експерименті, за своїми морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями були типовими.

Мікроорганізми вирощували на живильних середовищах, які готували та контролювали відповідно до вимог виробника (сертифікати до продукції та за Інформаційним листом МОЗ України № 05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль живильних середовищ», Київ, 2000).

Суспензії мікроорганізмів готували від-

повідно до стандарту мутності за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-Lameter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія) і доводили до оптичної щільності 0,5; 1,0 та 10,0 од. McFarland згідно з інструкцією до приладу. Синхронізацію культур проводили за допомогою дії низької температури.

Для отримання структурних компонентів (ультразвукових дезінтегратів) пробіотичних штамів лактобактерій (L) і сахароміцетів (S) як джерело ультразвукового випромінювання використовували генератор ГЗ–109 [5, 10]. Одержані структурні компоненти застосовували для вирощування пробіотичних культур *L. rhamnosus* та *S. boulardii* і дослідження щодо вивчення їхньої протидифтерійної активності в тестах *in vitro* й *in vivo*. Перед дослідженням структурні компоненти центрифугували при 1000g протягом 30 хв, а супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 з діаметром пор 0,2 мкм.

Отримання метаболітів (продуктів життєдіяльності) *L. rhamnosus* (ML) або *S. boulardii* (MS) здійснювали завдяки культивуванню продуцентів у власних структурних компонентах, метаболітів *S. boulardii* – у структурних компонентах *L. rhamnosus* (LS), комбінації метаболітів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* – у структурних компонентах лактобактерій (MLS) [5, 10].

Матеріалом для досліджень було шість експериментальних зразків: фільтрати ультразвукових дезінтегратів лактобактерій (L) і сахароміцетів (S; містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин або грибів); фільтрати культур лактобактерій (ML), сахароміцетів (MS), вирощених у власних ультразвукових дезінтегратах (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин або грибів); фільтрати спільних культур лактобактерій із сахароміцетами (MLS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин і грибів); фільтрати

культур сахароміцетів (LS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин і грибів).

Вивчення протимікробної активності структурно-метаболітних речовин відносно представників коринебактерій у тесті *in vitro* оцінювали кількісним методом [11]. Дослідження проводили у рідкому середовищі, що являло собою фільтрати структурних компонентів або метаболітних сполук *L. rhamnosus* чи *S. boulardii*. Дослідні зразки отримували додаванням бактеріальних суспензій *Corynebacterium spp.* до фільтратів культуральних рідин пробіотиків у співвідношенні 1:9. До експерименту бактеріальні суспензії тест-культур коринебактерій було взято в двох концентраціях. Одна концентрація мікробних суспензій *Corynebacterium* відповідала вимогам методичних рекомендацій, яку досягали розведенням суспензій мікроорганізмів з оптичною густиною 0,5 од. McFarland в 10 разів [11]. Друга концентрація суспензій коринебактерій відповідала оптичній густині 1,0 од. McFarland. Контрольні зразки містили відповідну тест-культуру *Corynebacterium* та розчин натрію хлориду. Експериментальні зразки інкубували при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 2 год експозиції з дослідних та контрольних зразків готували ряд послідовних розведень, з яких висівали 0,1 мл рідини на поверхню відповідного твердого живильного середовища. Посіви культивували при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Через добу підраховували кількість колоній, що виростили, та визначали число колонієутворюючих одиниць (КУО) в одиниці об'єму дослідного матеріалу.

Дослідження протидифтерійної активності структурно-метаболітних речовин в тесті *in vivo* досліджували на морських свинках. Очну хворобу дифтерійної етіології моделювали внутрішньоочним зараженням тварин суспензією промислового штаму *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+ PW-8 v. Massachusetts*. Морських свинок масою 250–

260 г розподіляли на 4 групи по 3 тварини. До I контрольної групи ввійшли тварини, яких не лікували, до II контрольної – тварини, яким застосовували розчин натрію хлориду (0,9%), до III і IV дослідних груп – тварини, що отримували експериментальні речовини (ML або MLS) тричі на день протягом 7 днів при закапуванні очей. Після повного зникнення ознак дифтерійного захворювання, завдяки місцевому застосуванню структурно-метаболітних речовин, забирали очний вміст та висівали на відповідне живильне середовище для виявлення мікробних клітин *Corynebacterium* щодо встановлення можливого бактеріоносійства [12].

Тварини перебували в стандартних умовах, при вільному доступі до води та їжі. Всі експерименти проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) відповідно до вимог Комітету з біоетики Інституту та положення «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Досліди проводили в трьох-чотирьох повторах. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали з використанням програми Statistica 6.0. Розподіл на нормальність виконували за допомогою критерію Пірсона. При відповідності нормальному розподілу достовірність різниці між отриманими показниками контрольних та дослідних груп визначали за критерієм t Стьюдента, розбіжності вважали достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень протимікробної активності структурних компонентів клітин та метаболітів *L. rhamnosus* щодо токсигенних представників роду *Corynebacterium* впродовж двогодинної експозиції обраним методом показали різну кількість КУО кори-

небактерій, яка залежала від початкової концентрації тест-культур, від досліджених структурно-метаболітних речовин та штаму мікроорганізму (рис. 1).

ML при застосуванні посівної дози 0,5 од. McFarland (розведеної в 10 разів), проявляють бактерицидні властивості відносно всіх (100%) обраних представників токсигенних коринебактерій ($n = 10$). При збільшенні концентрації мікробних клітин *Corynebacterium* до 1,0 од. McFarland показники життєздатності тест-культур підвищувалися ($\lg 1,58 \pm 0,51$ КУО/мл). Протимікробний ефект структурних компонентів лактобактерій щодо мікробних клітин *Corynebacterium* з посівною дозою 1,0 од. McFarland був достовірно нижчий ($\lg 3,13 \pm 0,53$ КУО/мл) порівняно з меншою посівною дозою ($\lg 0,23 \pm 0,2$ КУО/мл). Встановлено, що ефективність протимікробної активності L має пряму кореляційну залежність ($r = 0,321$) від початкової концентрації мікробних клітин *Corynebacterium*, взятих до експерименту (рис. 1).

Вищі протимікробні властивості відносно токсигенних коринебактерій ($n = 10$) з концентрацією мікробних клітин 1,0 од. McFarland порівняно з іншими зразками лактобактерій мала проба MLS. Число життєздатних клітин коринебактерій під впливом фільтратів спільних культур лактобактерій із сахароміцетами зменшувалося в 11,3 раза відносно контролю ($P < 0,05$). Тоді як протимікробний потенціал ML проявлявся зниженням кількості КУО коринебактерій в 4,8 раза, а L – в 2,4 раза. При зменшенні посівної дози клітин бактерій до 0,5 од. McFarland (розведеної в 10 разів), MLS, як і попередні зразки лактобактерій, бактерицидно впливала на 100% дослідних штамів токсигенних коринебактерій.

Протимікробна активність усіх фільтратів лактобактерій щодо мікробних клітин умовно-патогенних недифтерійних коринебактерій ($n = 6$) з посівною дозою 0,5 од. McFarland (розведеною в 10 разів)

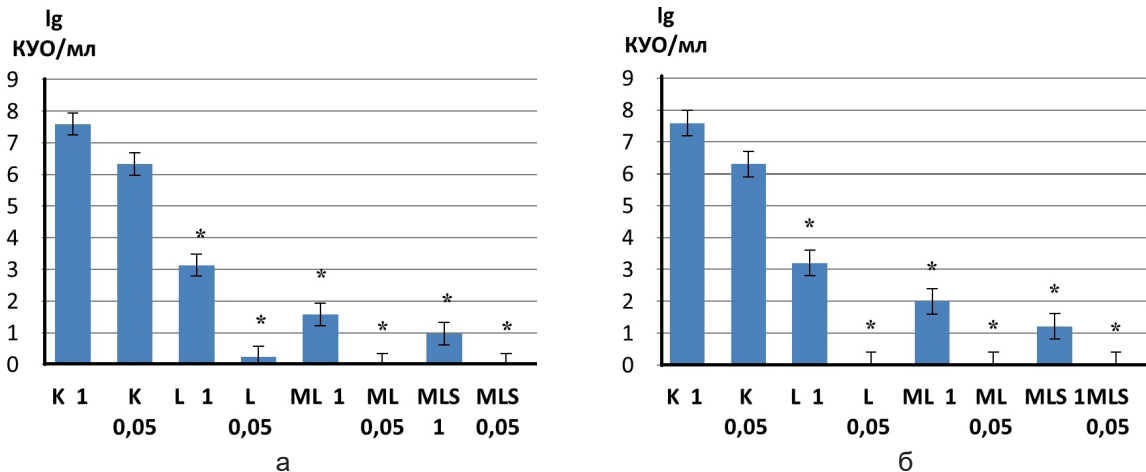


Рис. 1. Показники життєздатності токсигенних (а) та умовно-патогенних недифтерійних (*Corynebacteria non diphtheriae*) (б) представників коринебактерій після впливу фільтратів дезінтегратів лактобактерій (L), фільтратів метаболітів лактобактерій, отриманих при культивуванні продуцентів у власних дезінтегратах (ML), та метаболітів лактобактерій і сахароміцетів, отриманих при культивуванні мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій (MLS), 0,9%-го розчину натрію хлориду (K). Посівна доза тест-культур: 1–1,0 од. за шкалою McFarland; 0,05–0,5 од. McFarland, розведена в 10 разів

також була виражена: бактерицидна дія проявлялася відносно всіх обраних тест-культур (див рис. 1). При збільшенні посівної дози *Corynebacterium* до 1,0 од. McFarland спостерігався бактериостатичний ефект: під впливом MLS кількість життєздатних недифтерійних коринебактерій знижувалася в 6,8 раза, а ML – в 3,8 раза. Зменшення кількості КУО коринебактерій порівняно з контрольними значеннями спостерігалось для всіх дослідних зразків ($P \leq 0,05$) і обох концентрацій мікробних клітин *Corynebacterium*, взятих до експерименту. Проте найбільшу протидифтерійну активність щодо недифтерійних коринебактерій, як і до токсигенних представників роду *Corynebacterium*, проявляла проба MLS.

Результати двогодинного впливу фільтратів ультразвукових дезінтегратів та метаболітів сахароміцетів порівняно з фільтратами лактобактерій на показники життєздатності токсигенних представників роду *Corynebacterium* показали меншу чутливість обраних тест-культур (рис. 2). Кількісні показники життєздатності коринебактерій після експозиції у S та MS вищі, ніж у LS, при вживанні вищих посівних доз тест-культур. При

застосуванні нижчих концентрацій мікробних клітин *Corynebacterium* бактерицидний ефект фільтратів сахароміцетів спостерігався відносно більшості токсигенних представників. Достовірної різниці між кількісними показниками життєздатності токсигенних коринебактерій після їхньої інкубації в фільтратах сахароміцетів за умов застосування менших посівних доз тест-культур не виявлено (рис. 2).

Слід звернути увагу, що із 10 дослідних токсигенних представників роду *Corynebacterium* фільтрати сахароміцетів, після двогодинної експозиції, мали бактерицидний вплив на 8 тест-культур, а бактериостатична дія встановлена відносно двох штамів *Corynebacterium spp. tox +*, один із яких – промисловий штам *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+ PW-8 v. Massachusetts*. Отже, отримані результати свідчать про виражені протидифтерійні властивості структурно-метаболітних речовин сахароміцетів щодо токсигенних представників коринебактерій.

Результати впливу метаболітів і структурних компонентів *S. bouhardii* на життєздатність недифтерійних коринебактерій

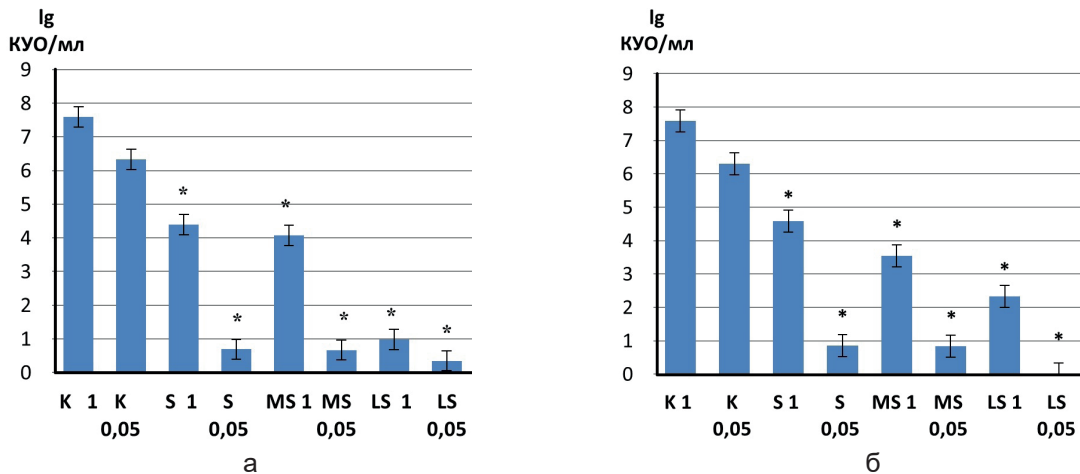


Рис. 2. Показники життєздатності токсигенних (а) та умовно-патогенних недифтерійних (*Corynebacteria non diphtheriae*) представників коринебактерій після впливу фільтратів дезінтегратів сахароміцетів (S), фільтратів метаболітів сахароміцетів, отриманих при культивуванні грибів у власних дезінтегратах (MS) та метаболітів сахароміцетів, отриманих при культивуванні грибів у дезінтегратах лактобактерій (LS), 0,9% розчину натрію хлориду (K). Посівна доза тест-культур: 1–1,0 од. за шкалою McFarland; 0,05–0,5 од. McFarland, розведена в 10 разів

показали близькі значення КУО з кількістю мікробних клітин токсигенних представників роду *Corynebacterium*. За виключенням проби LS, протимікробна активність якої до недифтерійних бактерій, за умов застосування вищих посівних доз тест-культур, була менша, ніж до токсигенних штамів *Corynebacterium*. Експозиція недифтерійних коринебактерій з нижчою початковою концентрацією у пробі LS призводила до втрати їхньої життєздатності.

Отримані в тестах *in vitro* результати збігаються з літературними даними інших досліджень щодо вираженого протимікробного ефекту структурних компонентів та метаболітів пробіотичних *L. rhamnosus GG* і *S. boulardii* відносно широкого спектра грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів [4, 13, 14]. Автори для дезінтеграції *Saccharomyces boulardii* також застосовували ультразвукові хвилі та центрифугування, котре дало змогу отримати супернатант сахароміцетів з протимікробними властивостями відносно *Escherichia coli* і *Candida albicans* [13].

Sahib зі співавт. [3] для підвищення антибактеріального ефекту до супернатанта

S. boulardii додавав нітрат срібла (AgNO_3). Отриманий авторами експериментальний засіб проявляв протимікробні властивості відносно полірезистентних мікроорганізмів: *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *S. typhi*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* і *P. mirabilis*. У попередніх наших публікаціях представлено високі антибактеріальні властивості відносно полірезистентних збудників метаболітів, отриманих за авторським методом, які не потребують додаткового удосконалення [2]. А результати цієї роботи доповнюють існуючі дані щодо широкого спектра дії продуктів життєдіяльності пробіотичних штамів сахароміцетів.

Іншими авторами встановлена відсутність протимікробної активності пробіотичних штамів *Lactobacillus* до патогенних мікроорганізмів і наявність антибактеріальних властивостей їхніх супернатантів. Доведено протистафілококовий ефект супернатантів *L. rhamnosus GG* відносно *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis* [6]. Група дослідників встановили, що 4-годинного впливу продуктів *L. rhamnosus GG* достатньо для зниження життєздатності *Shigella* на ~

4 log КУО / мл, *Listeria* і ентеропатогенної *E. coli* від 3 до 4 log КУО / мл, *Salmonella typhimurium* на ~ 5 log КУО / мл [14]. У наших попередніх працях підтверджено широкий спектр протимікробної дії метаболітів, одержаних за авторським способом, культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах, структурно-метаболітних речовин *L. rhamnosus GG* та їхня безпечність [6, 15]. А в представленій роботі доповнені дані щодо протидифтерійних властивостей фільтратів лактобактерій та встановлена їхня виражена протимікробна активність при інкубації патогенних збудників упродовж 2 год.

Роблячи висновки можна зазначити, що представлені зразки лактобактерій 100% бактерицидно впливають на представників токсигенних та недифтерійних *Corynebacterium* spp. у концентраціях, що відповідають вимогам методичних рекомендацій [11]. А проби сахароміцетів при двогодинній експозиції чинили бактерицидний вплив на 8 тест-культур і бактериостатичний на 2, серед яких був промисловий штам *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+ PW-8 v. Massachusetts*. Отже, запропонований авторами спосіб з отримання структурно-метаболітних речовин пробіотичного походження з вираженими протимікробними властивостями відкрив новий напрямок для створення метаболітних пробіотичних препаратів нового класу. Вивчення протимікробної дії біологічно активних сполук дало можливість охарактеризувати рівень протидифтерійних властивостей розроблених речовин й визначитися з силою впливу продуктів життєдіяльності і структурних компонентів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів на представників роду *Corynebacterium*. Наша робота також дала змогу порівняти ступінь активності структурних комплексів, метаболітних сполук *L. rhamnosus* і *S. boulardii* та їхніх комбінацій.

При відтворенні дифтерійної хвороби на морських свинках, у дослідах *in vivo*,

інфекційний процес розвивався гостро. Клінічна картина захворювання була виражена: спостерігалось почервоніння та набряк повік, кон'юнктивіт, гнійні виділення з очей. Загальний стан тварин відмічався як незадовільний, вони були мляві й малоактивні.

Для лікування змодельованого дифтерійного запалення очей (тричі на добу впродовж тижня) використовували найбільш активну щодо коринебактерій (за тестами *in vitro*) комбінацію MLS, а також метаболіти ML, які за попередніми дослідженнями в тестах *in vitro* проявили виражені антимікробні і антибіоплівкові властивості відносно полірезистентних грамнегативних мікроорганізмів [2]. По закінченні експерименту відмічалася статистично достовірна позитивна динаміка одужання дослідних тварин відносно контрольних. При застосуванні ML та MLS значно покращувався стан морських свинок: зникло почервоніння, припухлість й затвердіння повік, а також гнійні виділення. При мікробіологічному дослідженні очних виділень (на 7-му добу лікування) встановлено відсутність росту токсигенного представника промислового штаму *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+ PW-8 v. Massachusetts*, що підтверджує візуальні ознаки одужання тварин та свідчить про відсутність бактеріоносійства патогенних коринебактерій, а також – ефективність й перспективність додаткової терапії очних захворювань бактеріального походження за допомогою структурно-метаболітних комплексів пробіотичного походження.

Порівнюючи власні результати з подібними даними інших авторів нами підтверджена достатність триразового застосування на добу біологічно активної речовини. Так, Ubels і співавт. [16] при лікуванні тричі на добу рани рогівки у кроликів спостерігали підвищення загоєння на 21%, а збільшення лікування до п'яти разів – на 35%.

Вплив структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus GG* та *S. boulardii* на *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+ PW-8*

v. *Massachusetts* при змодельованій очній хворобі, викликаній дифтерійною інфекцією, супроводжувався не лише загоєнням рани та одужанням тварини (на 5-ту добу лікування), а й повною елімінацією токсигенного збудника на 7-му добу експерименту. В інших роботах при лікуванні захворювань дифтерійної етіології одужання наставало на 5–6-ту добу, проте бактеріоносійство й виділення збудника *Corynebacterium* тривало до 4 міс [17].

Одержані результати підтверджують попередньо отримані в тестах *in vitro* дані щодо високих протимікробних властивостей експериментальних речовин відносно *Corynebacterium spp. tox+* у стані формування біоплівки та сформованої зрілої біоплівки [2]. За тестами *in vitro* достовірно вищу активність до коринебактерій мала проба MLS, а в представленій публікації за тестами *in vivo* протидифтерійні властивості ML не поступалися вищезазначеній експериментальній речовині.

У практичній медицині лікування дифтерії ока проводиться педіатром спільно з офтальмологом наступним чином: місцево кожну годину і частіше промивають око розчином фурациліну 1:5000, слабким розчином перманганату калію з наступними інсталяціями та закладанням мазей (бажано антибіотиків тетрациклінового ряду). При ускладненнях проводять відповідне симптоматичне лікування [18]. Представлені власні позитивні результати застосування ML або MLS для місцевого лікування експериментальної дифтерійної інфекції очей морських свинок, які призвели до повного одужання лабораторних тварин, можуть в майбутньому значно спростити схему лікування захворювань дифтерійної етіології завдяки ефективній додатковій терапії.

ВИСНОВКИ

1. Отримані авторським способом структурно-метаболітні речовини *L. rhamnosus GG*

та *S. boulardii* мають високі протимікробні властивості відносно штамів *Corynebacterium spp. tox+* за тестами *in vitro*.

2. Завдяки спільному культивуванню *L. rhamnosus GG* і *S. boulardii* в ультразвуковому дезінтеграті лактобактерій підвищено протимікробні властивості одержаних продуктів життєдіяльності щодо патогенних коринебактерій.

3. Підтверджена протимікробна активність метаболітів лактобактерій та комбінації метаболітів лактобактерій і сахароміцетів, в тесті *in vivo*, й доведена їхня ефективність для місцевого лікування дифтерійної інфекції очей.

4. Представлені експериментальні результати щодо вираженої протимікробної активності структурних компонентів і продуктів життєдіяльності пробіотичних штамів *Lactobacillus rhamnosus GG* і *Saccharomyces boulardii* проти патогенних збудників дифтерії відкривають можливість конструювання, на основі біологічно активних речовин пробіотичного походження, протидифтерійних засобів для попередження розвитку безсимптомних форм дифтерійної інфекції, для санації носіїв дифтерії та додаткового місцевого лікування дифтерії ока.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Е. Ю. Исаенко

ПРОТИВОДИФТЕРИЙНЫЕ СВОЙСТВА СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ И САХАРОМИЦЕТОВ В ТЕСТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Исследовано *in vitro* и *in vivo* противомикробные свойства структурных компонентов и продуктов жизнедеятельности

пробиотических штаммов *Lactobacillus rhamnosus GG* и *Saccharomyces boulardii* против отдельных представителей патогенных возбудителей дифтерии и непатогенных коринебактерий. Дезинтеграты (структурные компоненты) получены благодаря низкочастотной ультразвуковой обработки пробиотических клеток *L. rhamnosus GG* или *S. boulardii*. Метаболиты получены по авторской методике путем культивирования лактобактерий и сахаромыцетов в собственных дезинтегратах, а их комбинация – в дезинтегратах лактобактерий. В тестах *in vitro* фильтраты лактобактерий через два часа воздействия бактерицидно действовали (100%) на токсигенные коринебактерии (n = 10) при применении посевной дозы тест-культур (0,5 ед. по шкале McFarland, разведенной в 10 раз), а фильтраты сахаромыцетов проявили меньшую активность (80%) по показателям жизнеспособности токсигенных представителей рода *Corynebacterium* (n = 10). Совместное культивирование *L. rhamnosus GG* и *S. boulardii*, в ультразвуковом дезинтеграте клеток пробиотических лактобактерий, способствовало повышению противомикробной активности комбинации метаболитов в отношении патогенных коринебактерий. В тесте *in vivo* на морских свинках установлена противомикробная активность метаболитов лактобактерий и комбинации метаболитов лактобактерий с сахаромыцетами и доказана их эффективность для местного лечения (три раза в сутки в течение недели) дифтерийной инфекции глаз. Полученные результаты могут быть использованы для создания на основе *Lactobacillus* и *Saccharomyces* противомикробных структурно-метаболитных комплексов для предупреждения развития бессимптомных форм дифтерийной инфекции, санации носителей дифтерии и дополнительного местного лечения дифтерии глаза. Ключевые слова: метаболиты; структурные компоненты; противомикробные свойства; дифтерия; *Lactobacillus rhamnosus GG*; *Saccharomyces boulardii*.

O. Y. Isayenko

ANTI-DIPHTHERIA PROPERTIES OF STRUCTURAL–METABOLITES COMPLEXES OF LACTOBACTERIA AND SACCHAROMYCES PROBIOTIC STRAINS

Antimicrobial properties of structural components and vital activity products of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus GG* and *Saccharomyces boulardii* against the individual representatives of pathogenic agents of diphtheria and nonpathogenic corynebacteria were investigated *in vitro* and *in vivo*. Disintegrates (structural components) were obtained with low–frequency ultrasonic treatment of probiotic cells of *Lactobacillus rhamnosus GG* or *Saccharomyces boulardii*. Metabolites were obtained using the author’s method by cultivating lactobacteria and saccharomycetes in their own disintegrates, and their combination – in the disintegrate of lactobacteria. In tests *in vitro*, the filtrates of lactobacteria metabolites compounds, if applied in a sowing test-culture dose

(0,5 units on the McFarland scale, diluted 10 times) within two hours of exposure, manifested bactericidal properties (100%) for toxicogenic corynebacteria (n=10). The filtrate of saccharomycetes structural components and metabolites showed less activity (80%) on vitality indicators of toxic *Corynebacterium* genus representatives (n = 10). The combined cultivation of *L. rhamnosus GG* and *S. boulardii* in the ultrasound disintegration of probiotic lactobacteria cells led to increase in antimicrobial activity of a combination of metabolites for pathogenic corynebacteria. In tests *in vivo* on guinea pigs, antimicrobial activity of lactobacteria metabolites and a combination of lactobacteria with saccharomycetes metabolites was established. Also, their efficacy for local treatment (three times a day during a week) of diphtheria infection of the eye was proved. The results obtained, can be used for development on the basis of *Lactobacillus* and *Saccharomyces* antimicrobial structural–metabolites complexes for prevention of asymptomatic forms of diphtheria infection, sanitation of diphtheria carriers and an additional local treatment of diphtheria of the eye.

Key words: metabolites; structural components; antimicrobial properties; diphtheria; *Lactobacillus rhamnosus GG*; *Saccharomyces boulardii*.

SE “I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine”, Kharkiv; e-mail: el_isaenko@ukr.net

REFERENCES

- Balabekyan TR, Karapetyan KJ, Khachatryan TV, Khachatryan G. Antimicrobial activity of preparations after combined cultivation of lactic acid bacteria and yeast strains. J Anim Physiol and Anim Nutr. 2018;102(4):933-8. [Russian].
- Isayenko OY, Knysh OV, Babysh YM, Ryzhkova TN, Dyukareva GI. Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria. Regul Mech Biosyst. 2019;10(1):3-8. [Ukrainian].
- Sahib FH, Aldujaili NH, Alrufae MM. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces boulardii* and study their biological activities. Eur J Pharm Med Res. 2017;4(9):65-74.
- Sarika AR, Lipton AP, Aishwarya MS. Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. Adv J Food Sci. Technol. 2010;2(5):291-7.
- Isayenko OYu, Knysh OV, Babysh YeM, Vashchenko V, Zachepylo SV, Polyanska VP, Kovalenko OI, Balak OK. inventor; DU«IMI NAMN», assignee. A method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria. Ukrainian patent. UA 126603. 2018 Jun. 25. [Ukrainian].
- Semenov AV. Antagonism as a result of inter-microbial relations. Bull Orenburg Sci Center UB RAS (electronic journal). 2013;31:1-7. [Russian].
- Ten threats to human health this year. World Health Orga-

- nization. Geneva, Switzerland. 2018.
8. Weekly Epidemiological Bulletin. World Health Organization. 2018; 23(93): 329-44.
 9. Kostyukova NN, Behalo VA. Diphtheria bacteriocarrier. *Epidemiol i Vaccinopr.* 2018; 17(5): 60-70. [Russian].
 10. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Kivva FV, Horbach TV, Balak OK. inventor; DU«IMINAMN», assignee. Method of producing metabolites of probiotic bacterial strains. Ukrainian patent UA 123122. 2018 Feb. 12. [Ukrainian].
 11. On approval of methodical instructions «Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs». Order Ministry of health of Ukraine. Pub. No. 167. (April 5, 2007). [Ukrainian].
 12. About measures to improve the bacteriological diagnosis of diphtheria in Ukraine. Order Ministry of health of Ukraine. Pub. No 192. (August 3, 1999). [Ukrainian].
 13. Ali MA, Janson JC, Ali E. Antimicrobial potential of *Saccharomyces boulardii* extracts and fractions. *J App Sci Res.* 2012; 8(8):4537-43.
 14. Liévin-Le MV, Servin AL. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):167-99.
 15. Isayenko OYu, Knysh OV, Falko OV, Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS. Cytotoxicity structural-metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. *Fiziol Zh.* 2019;65(5):40-8. [Ukrainian].
 16. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol.* 1983;95(3):353-8.
 17. Filosofova T. The pathogenesis of carriage of diphtheria infection. (electronic journal). [Russian].
 18. Kovalevsky E. Ophthalmology. Effective medicine. (electronic journal). [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 19.08.2019*